科学研究費助成專業 研究成果報告書



平成 27 年 5 月 2 9 日現在

機関番号: 15301 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2013~2014

課題番号: 25860603

研究課題名(和文)ヒト心臓内幹細胞から心筋細胞への分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism how human cardiac progenitor cells differentiate

into cardiomyocytes.

研究代表者

吉田 賢司 (YOSHIDA, Masashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号:70532761

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):心筋分化前後のヒト心臓内幹細胞に対してDNA microarrayで発現遺伝子解析を行った結果、ヒト心臓内幹細胞をラット新生児心筋細胞と共培養をすることで、ヒト内皮細胞にかかわる遺伝子群の発現が亢進していた。ヒト心筋細胞にかかわる遺伝子群に関してはヒト用DNA microarrayのチップにラットの遺伝子が反応したため、結果の解析には注意が必要と考えた。逆にヒト血管内は細胞ととなり、原内幹細胞を共活であると、ヒト心臓内幹細胞が 一過性に心筋様細胞に分化することがわかった。今後はヒト心筋細胞にかかわる遺伝子群の注意深い解析とともに、ヒ ト心臓内幹細胞が内皮細胞に分化する機序を探索する予定である。

研究成果の概要(英文): We compared expressed genes in human cardiac progenitor cells before and after cardiac differentiation by DNA microarray. We differentiated human cardiac progenitor cells into cardiomyocytes by co-culture those cells with neonatal rat ventricular myocytes. This comparison revealed that a set of genes which promote cells into endothelial cells was expressed in human cardiac progenitor cells. But a set of genes which are known to promote embryonic stem cells into cardiomyocytes was not able to be compared because DNA microarray chips reacted with rat genes. Careful interpretation may be need to understand the mechanism how human cardiac progenitor cells differentiate into cardiomyocytes with these results. On the other hand, we found that human progenitor cells can be transdifferentiate into cardiomyocytes by co-culture those cells with human endothelial cells

研究分野: 再生医療 心不全

キーワード: 心臓内幹細胞 内皮細胞 DNAマイクロアレイ

1.研究開始当初の背景

重症心不全の予後は不良であり幹細胞移植による心筋再生療法は根治的な治療法として期待される。特に不全心に対してヒト心臓内幹細胞移植の第一相臨床試験が最近行われ、注目されている。

そもそも 2001 年から心筋再生を目的として不全心に対し骨髄細胞移植・骨格筋芽細胞移植が行われた。しかしその効果は一定せず、安定した有効性を示せなかった。そのような背景の中、2011 年以降に不全心に対するヒト心臓内幹細胞移植が2 件報告された。一件は冠動脈バイパス術施で左室に上ト心臓内幹細胞を移植する方法で左室駆出率を約 8%改善し(Boli R et al. Lancet 2011; 378:1847)、一つは急性心筋梗塞後にヒト心臓内幹細胞を冠動脈内注入するにヒト心臓内幹細胞を冠動脈内注入するとい組織の再生を示した(Makkar RR et al. Lancet 2012; 379:895)。さらに日本国内においても不全心に対するとト心臓内幹細胞移植は2件、現在進行中である。

これら臨床試験の基礎的な検討として移植する細胞種により組織再生効果が異なることが報告され(Li TS et al. J Am Coll Cardiol. 2012; 59: 942)、心臓内幹細胞は細胞移植の源として有力であると考える。また我々は加齢によるヒト心臓内心筋細胞の老化で転写因子 TBX5 が減少し、心筋細胞への分化効率が低下していることを見出した。ただ心筋分化効率が高い新生児由来とト心臓内幹細胞でも心筋分化の割合はとり心筋分化効率を高める必要がある。

現在、心組織の再生に十分な心筋細胞を得るために様々な研究が行われている。ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞から心筋 細 胞 へ 分 化 す る 分 子 機 構 の 解 明 (Yamashita JK. Exp Cell Res. 2010; 316: 2555)や、線維芽細胞から心筋細胞への直接分化(Ieda M et al. Cell 2010; 142: 375)などである。しかしヒト心臓内幹細胞から心筋細胞への分化制御機構は研究されていない。

2. 研究の目的

1)ヒト心臓内幹細胞が心筋細胞に分化するときに変化する遺伝子群を解析する。次に変化した遺伝子群の中で 2)増加している遺伝子群をヒト心臓内幹細胞に必要な遺伝子、低下している遺伝子群をヒト心臓内幹細胞で分化を抑制している遺伝子として選出しヒト心臓内幹細胞の心筋細胞における分化制御機構を解明する。さらに解明した分化制御機

構を駆使することでヒト心臓内幹細胞の心筋分化誘導効率の改善が認められるか検討する。

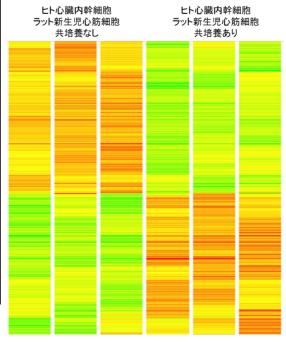
3.研究の方法

ヒト心臓内幹細胞をラット新生児心筋細胞と共培養することで、ヒト心臓内幹細胞から心筋細胞へ分化させる(Smith RR et al. Circulation 2007; 115: 896)。心筋分化効率の良い細胞株において、心筋分化前後のヒト心臓内幹細胞に対して affymetrix Human Genome U133を用いてDNA microarrayを行う。この際共培養の群ではラット新生児心筋細胞を取り除けないため、共培養しない群にはmRNA 採取の段階からラット新生児心筋細胞を加える。得られた結果をもとに分化した心筋細胞で増加した遺伝子群を心筋分化促進遺伝子の候補、減少した遺伝子群を心筋分化 抑制遺伝子の候補として選出する。

選出した候補を絞るために Lentivirus を使用 MHC プロモーターに GFP レポーター遺伝子を組み込んだヒト心臓内幹細胞を作製する (Kita-Matsuo H et al. PLoS One 2009;4:e5046)。次にレポーター導入幼児心臓内幹細胞に対して、各候補に対する siRNA を行いラット新生児心筋細胞と共培養により GFP 発現率が変動する候補を同定する。siRNA により GFP 発現率が減少した遺伝子を心筋分化促進遺伝子、GFP 発現率が増加した遺伝子を心筋分化促進遺伝子として同定し、ヒト心臓内幹細胞から心筋細胞への分化制御機構の全貌を明らかにする。

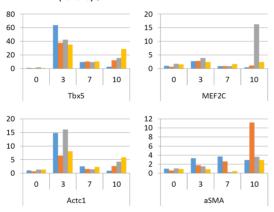
4.研究成果

ヒト心臓内幹細胞を心筋細胞に分化させた前後で変化のあった遺伝子を同定した(下図)。



その結果、ある遺伝子群が心筋分化刺激前後で変化していた。しかし注目していたすでに知られている心筋分化促進遺伝子は DNA microarrayがrat心筋由来遺伝子と反応したため、はっきりとした差は見いだせなかった。この点は現在注意深く解析中である。また近したのある遺伝子群には、PECAM なられていた。この協細胞しかない状態では人心臓内皮細胞の遺伝子群が増加していた。この筋細胞しかない状態では人心臓内内皮細胞へ分化するとことを明した。を軽析中である。この結果は、ヒト心臓内幹細胞を障害心筋に移植のよりに変した。

上記結果を踏まえ、ヒト内皮細胞とヒト心臓内幹細胞を共培養した。その結果、定量的RT-PCRでは共培養後3日目にTBX5が増加し心筋細胞マーカーであるACTC1が一過性に増加した。一方 SMA は同時期ほとんど変化しなかった(下図)。



このことから、ヒト心臓内幹細胞は血管内皮細胞と共存することで一過性に心筋細胞になるが、心筋細胞の形質を維持できずに多くが減少している可能性を示す。

現在は上記の結果を合わせ、人心臓内幹細胞が心筋細胞に分化する転写因子の候補をknockdown したヒト心臓内幹細胞が心筋細胞により分化するかどうか、方法で述べたレポーターアッセイを使用し、同定中である。これによりヒト心臓内幹細胞が心筋細胞に分化する調節機構を解明中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

[雑誌論文](計 2件)

Miyoshi T, Nakamura K, <u>Yoshida M</u>, et al. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats.

Cardiovasc Diabetol. 査読有 2014; 13: 43 DOI: 10.1186/1475-2840-13-43

Kobayashi J, <u>Yoshida M</u>, et al.
Directed Differentiation of
Patient-Specific Induced Pluripotent
Stem Cells Identifies the
Transcriptional Repression and
Epigenetic Modification of NKX2-5,
HAND1, and NOTCH1 in Hypoplastic Left
Heart Syndrome. PLOS one 查読有
2014;9: E102796

doi:10. 1371/journal.pone.0102796

[学会発表](計 1件)

M Yoshida, S Tarui, J Kobayashi, M Tohru, K Nakamura, Y Maeshima, S Sano, H Ito, H Oh: T-box 5 controls age-dependent cardiogenic activity in human cardiac progenitor cells through insulin-like growth factor-1 receptor signaling 学会名: ESC2014 発表年月日:2014/8/30 発表場所:バルセロナ、スペイン

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称明者: 推利者: 種類:

出願年月日: 国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号:

出願年月日: 取得年月日: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

- 6.研究組織 (1)研究代表者 吉田 賢司 (YOSHIDA, Masashi) 岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 研究者番号:70532761 (2)研究分担者 ()
- 研究者番号: (3)連携研究者 ()

研究者番号: